

BRUNO FLUMIAN

**Avaliação biomecânica da
influência da microgeometria na
osseointegração de implantes
instalados em tíbias de ratos
expostos à nicotina**

**Araçatuba – SP
2014**

BRUNO FLUMIAN

**Avaliação biomecânica da
influência da microgeometria na
osseointegração de implantes
instalados em tíbias de ratos
expostos à nicotina**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba, da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de
Almeida

**Araçatuba – SP
2014**

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Nilton, por ser essa pessoa tão admirável, você é meu exemplo de vida.

À minha irmã Bárbara, que me apoia sempre, te amo!

À minha família que está sempre presente e unida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao professor Juliano, por permitir que eu participasse desse projeto, aprendi muito com isso.

À Paulinha, ao Samuel e à Duda, meus amigos e companheiros que me ajudaram bastante com esse trabalho.

À toda a turma da Periodontia da FOA, professores e pós graduandos pela receptividade e atenção que me deram, um abraço à todos!

À todos os meus amigos da graduação, vocês fizeram parte da melhor época da minha vida, sou eternamente grato a vocês e, com certeza, vou levar lembranças de vocês para sempre!

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

FLUMIAN, B. **Avaliação biomecânica da influência da microgeometria na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos expostos à nicotina.** 2014. 37 Páginas Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

As modificações na macro e microgeometria dos implantes dentários têm por objetivo aumentar a superfície de contato osso-implante e favorecer a osseointegração principalmente em osso menos denso. Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar, biomecanicamente, a influência da microgeometria na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina. Oitenta ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grandes grupos experimentais (n=40) submetidos a aplicações de solução salina (SS) ou de nicotina (NIC). Após 30 dias do início das aplicações, os animais foram aleatoriamente distribuídos em subgrupos (n=20) onde implantes (4,0 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro) de diferentes tratamentos de superfície confeccionados por meio de jateamento e ataque ácido foram instalados no alvéolo cirúrgico: SS-AC - superfície em escala micrométrica; SS-Nano - superfície em escala nanométrica; NIC-AC - superfície em escala micrométrica; NIC-Nano - superfície em escala nanométrica. Dez animais de cada grupo foram eutanasiados aos 30 e 60 dias pós-operatórios. As tíbias foram submetidas avaliação biomecânica pelo teste de torque reverso. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A nicotina não reduziu o torque de remoção de implantes de titânio instalados em tíbia de ratos. Aos 30 dias pós-operatórios, os grupos SS-AC e NIC-AC apresentaram maior torque de remoção em relação ao grupo SS-Nano ($p \leq 0,05$). Aos 60 dias pós-operatórios, o grupo SS-AC

apresentou maior torque de remoção em relação ao grupo NIC-Nano ($p \leq 0,05$). Dentro dos limites do presente estudo, concluiu-se que a nicotina não reduz o torque de remoção dos implantes instalados em tíbia de ratos, sugerindo que ela não interfere no processo de osseointegração, enquanto a superfície em escala micrométrica aumentou o torque de remoção dos implantes instalados em tíbia de ratos modificados ou não pela nicotina.

Palavras-chave: Implantes Dentários. Osseointegração. Nicotina.

FLUMIAN, B. **Biomechanical evaluation of the influence of microgeometria in osseointegration installed in rats tibias exposed to nicotine implants.** 2014. 37 Pages Work. Course Completion (Bachelor) - Dental School of Araçatuba, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

Changes in the macro and microgeometria of dental implants are designed to increase the contact surface of bone-implant and promote osseointegration especially in less dense bone. Thus, this study aims to evaluate biomechanically, the influence of microgeometria in osseointegration of implants placed in the tibia of rats exposed to nicotine or not. Eighty rats were randomly divided into two major experimental groups (n = 40) receiving saline solution (SS) or applications of nicotine (NIC). Thirty days after the start of application, the animals were randomly divided in subgroups (n = 20) which implants (4.0 mm long and 2.2 mm diameter) with different surface treatments made by sandblasting and etching were installed in the surgical alveolus: SS-AC - surface in micrometer scale; Nano-SS - surface at the nanometer scale; NIC-AC - surface in micrometer scale; NIC-Nano - surface at the nanometer scale. Ten animals from each group were euthanized at 30 or 60 days postoperatively. The tibias were submitted to biomechanical evaluation by reverse torque test. Data were statistically analyzed by ANOVA test followed by Tukey post-test ($p \leq 0.05$). Nicotine did not reduce the removal torque of titanium implants installed in tibias. At 30 days postoperatively, the SS-AC and AC-NIC groups showed higher removal torque compared to Nano-SS ($p \leq 0.05$) group. At 60 days postoperatively, the SS-AC group had a higher removal torque compared to the NIC-Nano ($p \leq 0.05$) group. Within the limits of the present study, it was concluded that nicotine does not reduce the removal torque of the implants placed in the tibia of rats, suggesting that it does not influence the osseointegration process, while the surface micrometer scale increased the removal torque of the implants installed in the tibia of rats modified or not by nicotine.

Keywords: Dental Implants. Osseointegration. Nicotine.

LISTA DE FIGURAS

figura 1	Aplicação de injeções subcutâneas de solução salina nos animais dos grupos SS e nicotina nos animais dos grupos NIC.	33
figura 2 -	Incisão pelo lado medial da tíbia e exposição do tecido ósseo com descolador de periósteo	33
figura 3 -	Preparo do alvéolo cirúrgico na metáfise proximal com broca.	34
figura 4 -	Instalação do implante no alvéolo cirúrgico com auxílio de uma chave digital acoplada ao hexágono do implante	34
figura 5 -	Peça estabilizada em morsa para avaliação biomecânica.	35
figura 6	Contra torque de remoção dos implantes no grupo controle.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvio padrão ($M \pm DP$) dos dados biomecânicos 32 (N.cm) em cada grupo e períodos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	=	Análise de variância
CEEA	=	Comissão de Ética em Experimentação Animal
cm ²	=	Centímetros quadrados
DP	=	Desvio padrão
EDTA	=	Ácido etilenodiaminotetracético
FAPESP	=	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
g	=	Gramas
h	=	Horas
H&E	=	Hematoxilina e eosina
M	=	Média
mg/kg	=	Miligramas por quilogramas
mg/ml	=	Miligramas por mililitros
min	=	Minutos
ml	=	Mililitros
s	=	Segundos (unidade de medida de tempo)
µg/ml	=	Micrometros por mililitros
SS	=	Solução salina
NIC	=	Nicotina
Mm	=	Milímetros
N/Cm	=	Newtons por centímetro

LISTA DE SÍMBOLOS

$<$	=	Menor
$\leq$	=	Menor ou Igual
$=$	=	Igual
$+$	=	Mais
$\pm$	=	Mais ou menos
$\textcircled{R}$	=	Marca registrada
β	=	Beta
x	=	Veze
n	=	Tamanho da amostra
p	=	Probabilidade do valor do teste
n°	=	Número
$\%$	=	Por Cento
$^{\circ}\text{C}$	=	Graus Celcius

LISTA DE ANEXOS

Anexo -	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)	36
---------	---	----

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Materiais e métodos	16
3. Resultados	19
4. Discussão	19
5. Conclusão	24
Referências	25
Anexo	36

1. Introdução

A osseointegração (estreita interação entre osso e dispositivo implantável) (BRÅNEMARK et al., 1969) deu à implantologia o status de uma das modalidades de reabilitação mais bem-sucedidas no campo da medicina, muitas vezes, com taxas de sucesso superior a 95% ao longo de vários anos (LEVINE et al., 2002; CHUANG; CAI, 2006; ZUPNIK et al., 2011; COELHO et al., 2011). Embora esse sucesso a longo-prazo esteja bem estabelecido, falhas ainda podem ocorrer e o tabagismo é um dos fatores de risco frequentemente associado (LAMBERT et al., 2000; EKFELDT et al., 2001; HINODE et al., 2006).

Um estudo (BAIN; MOY, 1993) que investigou 540 pacientes com 2194 implantes Branemark, considerou o uso do tabaco o fator mais significativo responsável por falhas de implantes dentais. Mais recentemente, Sánchez-Pérez et al. (2007) sugeriram que o consumo superior a 20 cigarros/dia pode aumentar o risco de falhas de implantes em 30,8%. O tabaco também está associado com comprometimento do processo de reparo ósseo pós-operatório (PINTO et al., 2002; MACHADO et al., 2010), maior taxa de perda óssea, redução da qualidade e densidade óssea (CARLSSON et al., 2000; WARD; KLESGES 2001) e maior incidência de peri-implantites (HAAS et al., 1996), todos contribuindo para maior taxa de falências de implantes entre fumantes em comparação com não fumantes (CHUANG et al., 2002).

A nicotina, maior componente ativo da fase particulada do cigarro (BENOWITZ 1986), parece causar severas alterações no metabolismo e capacidade de reparo ósseo (CÉSAR-NETO et al. 2003), uma vez que pode causar (1) severa vasoconstrição, a qual diminui a perfusão sanguínea e causa baixa concentração de oxigênio e isquemia tecidual (MA et al. 2010, (2) redução na biossíntese do colágeno

(SØRENSEN 2012) e (3) alterações na proliferação, diferenciação e expressão gênica de osteoblastos (ROTHERM et al. 2011). No âmbito da implantodontia oral, apesar de alguns autores não terem observado efeito prejudicial da nicotina sobre o reparo ósseo e osseointegração (STEFANI et al., 2002, BALATSOUKA et al., 2005a, BALATSOUKA et al., 2005b, GOTFREDSEN et al., 2009), vários estudos histológicos em modelos animais mostraram que o tabagismo pode resultar em diminuição do contato osso/implante e menor área óssea dentro das roscas de implantes de titânio (NOCITI JÚNIOR et al., 2002; CÉSAR-NETO et al. 2003; CÉSAR-NETO et al., 2005).

Na tentativa de se obter osseointegração mais rápida e otimizar a vida útil dos implantes, vários métodos envolvendo o aperfeiçoamento da sua composição em massa (UCAR et al., 2011), molhabilidade (MICHIARDI et al., 2007) e topografia da superfície (DALBY et al., 2007; LAMERS et al., 2010) têm sido testados. Com respeito à topografia da superfície, tem sido relatado que as suas características físico-químicas podem afetar as reações biológicas que ocorrem na interface osso/implante (KIM et al. 2008). Do ponto de vista de estudos pré-clínicos, é geralmente aceito que a introdução casual de macro- ou micro-rugosidades na superfície do biomaterial afeta positivamente a osseointegração (SATO et al., 2009). Foi observado que uma superfície rugosa em escala de micron preparada por jateamento e subsequente ataque ácido foi capaz de aumentar e acelerar a formação óssea nos implantes de titânio (MENDONÇA et al. 2008). Por outro lado, nanoestruturas na superfície do implante criadas por tratamentos químicos também tem demonstrado atividade biológica favorável (WANG et al. 2011). Foi sugerido que os tratamentos da superfície poderiam melhorar a fixação, espalhamento, adesão,

proliferação e diferenciação dos osteoblastos na superfície dos implantes (KUBO et al. 2009).

Com base no avanço das novas tecnologias e diversos tipos de tratamento de superfície criados, os quais poderiam aumentar a qualidade e o sucesso a longo-prazo dos implantes dentais, o presente estudo teve como objetivo avaliar, biomecanicamente, a influência da microgeometria na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina.

2. Materiais e métodos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Campus de Araçatuba, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (protocolo nº 01641-2012).

2.1. Animais

Foram utilizados 80 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250 a 300 g provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, os quais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grandes grupos experimentais (n=40) submetidos a aplicações de solução salina (SS) ou de nicotina (NIC).

2. Protocolos Experimentais

2.1. Protocolo para aplicação da nicotina e solução salina

A cada 12 horas os animais receberam injeções subcutâneas de nicotina ou solução salina na região dorsal (Figura 1) em horário pré-estabelecido por um período de 30 dias que antecederam o procedimento cirúrgico até o momento da eutanásia. O hemissulfato de nicotina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi diluído em solução salina na concentração de 5mg/ml. Para cada animal foi administrado um volume da solução diluída, na dosagem de 3mg/kg de peso de acordo com o protocolo de Okamoto et al.⁷⁰. A administração da solução salina (cloreto de sódio

0,9%) foi realizada com o objetivo de simular as mesmas condições de estresse diário proveniente das aplicações de nicotina.

2.2. Protocolo de instalação dos implantes e grupos experimentais

Após 30 dias do início das aplicações de nicotina/solução salina, foi realizado o procedimento para instalação dos implantes na tíbia direita e esquerda de todos os animais. Para isso, os animais foram anestesiados pela associação de 0,04ml/100g de cloridrato de quetamina (Vetaset, Fort Dodge Iowa, USA) e 0,02ml/100g de cloridrato de xilazina (Coopazine, Coopers São Paulo, Brasil), as tíbias foram tricotomizadas e foi realizada a antissepsia com iodopovidona a 10 %. Os animais foram então posicionados em mesa operatória apropriada para acesso ao leito cirúrgico. Foi feita uma incisão pelo lado medial da tíbia de aproximadamente 30 mm, com auxílio de uma lâmina de bisturi 15 e o tecido ósseo foi exposto com auxílio de um deslocador de periósteo (Figura 2). Um alvéolo cirúrgico bicortical foi preparado na metáfise proximal, usando uma fresa (Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, São Paulo, Brasil - 2,0 mm de diâmetro) (Figura 3) montada em motor cirúrgico (Ômega, Dentscler Indústria de aparelhos Odontológicos Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) com torque de 45 N e velocidade de 1200 rpm sob irrigação constante de solução salina. Neste momento os animais foram aleatoriamente distribuídos em subgrupos (n=20) onde implantes (4,0 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro) de diferentes tratamentos de superfície, confeccionados por meio de jateamento e ataque ácido, foram instalados no alvéolo cirúrgico: SS-AC - superfície em escala micrométrica; SS-Nano - superfície em escala nanométrica; NIC-AC - superfície em escala micrométrica; NIC-Nano - superfície em escala nanométrica. Todos os implantes foram instalados com auxílio de chave digital (1,2 mm) acoplada ao hexágono do

implante (Figura 4) até que o mesmo ficasse posicionado no nível ósseo. Em seguida, o tecido muscular foi suturado com fio 4.0 de poliglactina 910 (Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod. Para Saúde Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil), e o epitélio com fio de seda 4.0 (Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod. Para Saúde Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil). Por fim, os animais receberam uma injeção intramuscular de penicilina e estreptomicina (Pentabiótico Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, Brasil).

2.3. Períodos experimentais

Dez animais de cada grupo foram eutanasiados por meio de superdosagem anestésica 150mg/kg (thiopental - Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil) aos 30 e 60 dias após a instalação dos implantes. As tíbias foram coletadas, dissecadas para a exposição dos implantes e submetidas à avaliação biomecânica pelo teste de torque reverso.

2.4. Avaliação biomecânica

As peças foram estabilizadas em uma morsa (Figura 5) e, com o auxílio de uma chave hexagonal (1,2 mm) conectada ao implante e a um torquímetro manual, o implante foi removido por meio de movimento anti-horário. O torquímetro registrou a força necessária para romper a osseointegração do implante (Figura 6). Tomou-se muito cuidado para que não fosse aplicada força na direção vertical, o que poderia levar alterações nos valores registrados. Os valores, expressos em N.cm, foram coletados e submetidos à análise estatística.

2.5. Análise estatística

A hipótese de não haver diferença estatística entre os dados foi testada pelo software Bioestat 5.0. Após análise de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$), foi realizada a análise intragrupo e intergrupo utilizando o teste ANOVA ($p \leq 0,05$), seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$) quando o teste ANOVA detectou diferença entre os dados.

3. Resultados

A comparação intergrupos mostrou que os animais dos grupos SS-AC e NIC-AC apresentaram maior torque de remoção quando comparados aos animais do grupo SS-Nano, aos 30 dias pós-operatórios ($p \leq 0,05$). Também foi observado que os animais do grupo SS-AC apresentaram maior torque de remoção quando comparados aos animais do grupo NIC-Nano, aos 60 dias pós-operatórios ($p \leq 0,05$).

A comparação entre os períodos mostrou que houve maior torque de remoção dos implantes aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 30 dias pós-operatórios nos grupos SS-AC, SS-Nano e NIC-Nano ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados na Tabela 1.

4. Discussão

É sabido que a quantidade e qualidade óssea são fundamentais para garantir a estabilidade dos implantes dentais (MARCO et al. 2005). Estudos clínicos e experimentais relataram que cirurgias de implantes em sítios com baixa densidade óssea oferecem um pobre prognóstico e causam diminuição da ancoragem de implantes (FINI et al. 2001, FINI et al. 2004, SZABO; MANDREKAR 2009).

Considerando-se as evidências de que características como rarefação, baixa massa óssea e alterações na microarquitetura óssea, frequentemente observadas em

indivíduos fumantes, poderiam comprometer a osseointegração por interferir na estabilidade dos implantes a curto e a longo-prazo (GALINDO-MORENO et al. 2005), e que modificações na macro e microgeometria dos implantes têm por objetivo aumentar a superfície de contato osso-implante e favorecer a osseointegração principalmente em ossos menos denso (AHN et al. 2014), o presente estudo teve por objetivo avaliar, do ponto de vista biomecânico, a influência da microgeometria no torque de remoção de implantes de titânio instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina.

Ao comparar os grupos de animais com implantes de mesma microgeometria, os nossos resultados demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa no torque de remoção de implantes instalados em animais tratados com nicotina e animais tratados apenas com solução salina, sugerindo que a osseointegração não foi prejudicada pela nicotina. Tais resultados corroboram com os resultados de outros estudos prévios que também não observaram do efeito negativo da nicotina no torque de remoção de implantes instalados em tíbias e fêmures de coelhos (BALATSOUKA et al., 2005a; BALATSOUKA et al., 2005b).

Nos estudos descritos, além da avaliação biomecânica pelo teste de torque de reverso, outros parâmetros avaliados, tais como (a) frequência de ressonância, (b) porcentagem de contato osso-implante, (c) área de osso neoformado e (d) densidade óssea dentro das roscas dos implantes e (e) densidade óssea no leito cirúrgico sem instalação do implante, não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais tratados com nicotina e controle. Com os resultados, os autores sugeriram não haver influência significativa da exposição à nicotina na cicatrização óssea e osseointegração e chamaram atenção para o fato de que a nicotina é apenas uma das muitas substâncias presentes no tabaco, e que

os efeitos negativos do fumo sobre o metabolismo ósseo poderiam estar mais relacionados com outros fatores do que com a nicotina (HOFFMANN et al. 2001; BALATSOUKA et al. 2005). Os achados corroboram com os estudos de Stefani et al. (2002) e Nociti et al. (2002), os quais também não observaram diminuição nos valores de contato osso-implante e densidade óssea em animais expostos a injeções subcutâneas de nicotina.

Outra explicação sugerida (BALATSOUKA et al. 2005) foi de que o período de um mês de exposição à nicotina previamente à instalação do implante foi relativamente curto e pode não ter sido suficiente para causar impacto negativo na cicatrização óssea. Contudo, em um estudo mais recente (GOTFREDSEN et al. 2009), um período de seis meses de exposição à nicotina previamente à instalação do implante também não foi capaz de causar alterações nos valores de torque de remoção, contato osso-implante e densidade óssea. Apesar dos resultados indicarem uma relativa segurança da exposição à nicotina em períodos de até seis meses, os autores sugerem que os dados apresentados requerem cuidadosa interpretação. Essa consideração se faz importante uma vez que a nicotina parece causar severas alterações no metabolismo e capacidade de reparo ósseo (CÉSAR-NETO et al. 2003).

Estudos *in vitro* (YIN et al. 2000; WONG et al. 2004) demonstraram que ela foi capaz de levar a: (a) inibição da proliferação, migração, quimiotaxia e redução na produção de colágeno tipo I e III, os quais constituem importantes componentes orgânicos da matriz extracelular e atuam como arcabouço para a deposição de íons no processo de mineralização do tecido ósseo (BOSKEY 1992); (b) suprimir a osteogênese reduzindo a concentração de fosfatase alcalina (TANAKA et al. 2005), necessária para a mineralização da matriz óssea (ANDERSON 1989); (c) levar a alterações na

proliferação, na diferenciação e na expressão gênica de osteoblastos (ROTHEM et al. 2011); (d) promover severa vasoconstrição, a qual diminui a perfusão sanguínea e causa baixa concentração de oxigênio e isquemia tecidual (MA et al. 2011) e (e) diminuir a expressão gênica de VEGF e BMP-2 em estudos in vitro (MA et al. 2011) e in vivo (MA et al. 2010). Assim, com base nesses achados, pode-se considerar que os mecanismos nos quais a nicotina poderia comprometer a osseointegração de implantes de titânio ainda permanecem como um tópico inconclusivo e de muito interesse para futuras investigações.

Com relação à microgeometria dos implantes dentais, até o presente momento, apenas um relato na literatura associou diferentes tratamentos de superfícies de implantes com a administração sistêmica da nicotina (STEFANI et al. 2002). No modelo experimental, realizado em coelhos, foram utilizados implantes com superfície jateada com partículas de Al_2O_3 e implantes com superfície usinada. Os autores concluíram que, embora a administração da nicotina não tivesse influenciado a cicatrização óssea ao redor de implantes, o tratamento da superfície melhorou a osseointegração apenas nos grupos em que ela foi administrada.

No presente estudo nós avaliamos a influência do tratamento de superfície em escala nanométrica comparado ao tratamento de superfície em escala micrométrica, por jateamento e ataque ácido. O uso de implantes dentários com topografia de superfícies em escala nanométrica tem despertado o interesse de muitos pesquisadores e está rapidamente se tornando parte da implantodontia moderna (THAKRAL et al. 2014). Foi relatado que as modificações da topografia de superfície pela nanotecnologia podem melhorar drasticamente as respostas celulares e teciduais para beneficiar a osseointegração (THAKRAL et al. 2014).

Em um recente estudo (MENG et al. 2003) que investigou os mecanismos moleculares em período inicial do processo de osseointegração em superfícies de escala nanométrica e micrométrica relatou que as superfícies nanométricas aceleraram e aprimoraram o reparo ósseo, pelo recrutamento de genes envolvidos no desenvolvimento esquelético, ossificação e diferenciação de osteoblastos. Também foi relatado que a superfície nanométrica diminuiu com mais rapidez as respostas imunológica e inflamatória. Os autores concluíram que a nanosuperfície do implante poderia fornecer base para uma forma de se conseguir osso mais rapidamente e em maior quantidade. Assim, alterações no desenho do implante e de suas superfícies foram sugeridas para aumentar o sucesso na osseointegração em tecido ósseo de má qualidade o que, hipoteticamente, proporcionaria melhor fixação e maior área de superfície de carga, reduzindo o stress em tipos mais moles de osso (AHN et al. 2014), justificando a presente investigação.

Contudo, apesar desses achados, no presente estudo os animais com implantes de superfície em escala micrométrica dos grupos SS-AC e NIC-AC apresentaram maior torque de remoção quando comparados aos animais com implantes de superfície em escala nanométrica do grupo SS-Nano, aos 30 dias pós-operatórios. Aos 60 dias pós-operatórios, os animais do grupo SS-AC também apresentaram maior torque de remoção em relação aos animais do grupo NIC-Nano. Na avaliação biomecânica pelo teste de torque reverso a força de remoção aumentada pode ser geralmente interpretada como uma melhora na cicatrização óssea ao redor dos implantes e o “aprimoramento” da osseointegração. Assim, tais resultados sugerem que a superfície em escala micrométrica oferece melhores condições para satisfazer a osseointegração do que a superfície em escala nanométrica, corroborando com o estudo de AHN et al. (2014).

5. Conclusão

Dentro dos limites do presente estudo, concluiu-se que a nicotina não reduz o torque de remoção de implantes de titânio instalados em tíbia de ratos, sugerindo que ela não interfere no processo de osseointegração, enquanto o implante de superfície em escala micrométrica aumentou o torque de remoção de implantes de titânio instalados em tíbia de ratos modificados ou não pela nicotina.

Agradecimentos

A **DSP Biomedical®** pelo fornecimento dos implantes.

REFERÊNCIAS

- AHN S, VANG MS, YANG HS, PARK SW, LIM HP. Histologic evaluation and removal torque analysis of nano- and microtreated titanium implants in the dogs. **J Adv Prosthodont.**, v.1, n.2, p.75-84, 2009.
- ANDERSON HC. Mechanism of mineral formation in bone. **Lab Invest.**, v.60, n.3, p.320-30, 1989.
- BAIN CA, MOY PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v.8, n.6, p.609-15, 1993.
- BALATSOUKA D, GOTFREDSEN K, LINDH CH, BERGLUNDH T. The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. **Clin Oral Implants Res.**, v.16, n.3, p.268-76, 2005.
- BALATSOUKA D, GOTFREDSEN K, LINDH CH, BERGLUNDH T. The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. **Clin Oral Implants Res.**, v.16, n.4, p.389-95, 2005.
- BENOWITZ NL. Clinical pharmacology of nicotine. **Annu Rev Med.**, v.37, p.21-32, 1986.
- BERLEY J, YAMANO S, SUKOTJO C. The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. **J Oral Implantol.**, v.36, n.3, p.185-93, 2010.
- BOSKEY AL. Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* v.281, p. 244-74, 1992.
- BRÅNEMARK PI, ADELL R, BREINE U, HANSSON BO, LINDSTRÖM J, OHLSSON A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand J Plast Reconstr Surg.**, v.3, n.2, p.81-100, 1969.
- CARLSSON GE, LINDQUIST LW, JEMT T. Long-term marginal periimplant bone

loss in edentulous patients. **Int J Prosthodont.**, v.13, n.4, p. 295-302, 2000.

CÉSAR-NETO JB, BENATTI BB, SALLUM EA, NOCITI FH JR. Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v.20, n.5, p.713-9, 2005.

CÉSAR-NETO JB, DUARTE PM, SALLUM EA, BARBIERI D, MORENO H JR, NOCITI FH JR. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. **J Periodontol.**, v.74, n.10, p.1454-9, 2003.

CHUANG SK, CAI T. Predicting clustered dental implant survival using frailty methods. **J Dent Res.**, v.85, n.12, p.1147-51, 2006.

CHUANG SK, WEI LJ, DOUGLASS CW, DODSON TB. Risk factors for dental implant failure: a strategy for the analysis of clustered failure-time observations. **J Dent Res.**, v.81, n.8, p.572-7, 2002.

COELHO PG, GRANATO R, MARIN C, TEIXEIRA HS, SUZUKI M, VALVERDE GB, JANAL MN, LILIN T, BONFANTE EA. The effect of different implant macrogeometries and surface treatment in early biomechanical fixation: an experimental study in dogs. **J Mech Behav Biomed Mater.**, v.4, n.8, p.1974-81, 2011.

DALBY MJ, GADEGAARD N, TARE R, ANDAR A, RIEHLE MO, HERZYK P, WILKINSON CD, OREFFO RO. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. **Nat Mater.**, v.6, n.12, p.997-1003, 2007.

EKFELDT A, CHRISTIANSSON U, ERIKSSON T, LINDÉN U, LUNDQVIST S, RUNDCRANTZ T, JOHANSSON LA, NILNER K, BILLSTRÖM C. A retrospective

analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. **Clin Oral Implants Res.**, v.12, n.5, p. 462-7, 2001.

ESPOSITO M, HIRSCH JM, LEKHOLM U, THOMSEN P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I) Success criteria and epidemiology. **Eur J Oral Sci.**, v.106, n.1, p.527-51, 1998.

FINI M, GIAVARESI G, TORRICELLI P, BORSARI V, GIARDINO R, NICOLINI A, CARPI A. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. **Biomed Pharmacother.**, v.58, n.9, p.487-93, 2004.

FINI M, GIAVARESI G, TORRICELLI P, KRAJEWSKI A, RAVAGLIOLI A, BELMONTE MM, BIAGINI G, GIARDINO R. Biocompatibility and osseointegration in osteoporotic bone. **J Bone Joint Surg Br.**, v.83, n.1, p.139-43, 2001.

GALINDO-MORENO P, FAURI M, AVILA-ORTIZ G, FERNÁNDEZ-BARBERO JE, CABRERA-LEÓN A, SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ E. Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: a prospective study. **Clin Oral Implants Res.**, v.16, n.5, p.579-86, 2005.

GOTFREDSEN K, LINDH CH, BERGLUNDH T. Does longstanding nicotine exposure impair bone healing and osseointegration? An experimental study in rabbits. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v.91, n.2, p.918-23, 2009.

HAAS R, HAIMBÖCK W, MAILATH G, WATZEK G. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. **J Prosthet Dent.**, v.76, n.6, p.592-6, 1996.

HINODE D, TANABE S, YOKOYAMA M, FUJISAWA K, YAMAUCHI E, MIYAMOTO Y. Influence of smoking on osseointegrated implant failure: a meta-analysis. **Clin Oral Implants Res.**, v.17, n.4, p. 473-8, 2006.

HOFFMANN D, HOFFMANN I, EL-BAYOUMY K. The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. **Chem Res Toxicol.**, v.14, n.7,

p.767-90, 2001.

KIM TI, JANG JH, KIM HW, KNOWLES JC, KU Y. Biomimetic approach to dental implants. **Curr Pharm Des.**, v.14, n.22, p.2201-11, 2008.

KUBO K, TSUKIMURA N, IWASA F, UENO T, SARUWATARI L, AITA H, CHIOU WA, OGAWA T. Cellular behavior on TiO₂ nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. **Biomaterials.**, v.30, n.29, p.5319-29, 2009.

LAMBERT PM, MORRIS HF, OCHI S. The influence of smoking on 3-year clinical success of osseointegrated dental implants. **Ann Periodontol.**, v.5, n.1, p.79-89, 2000.

LAMERS E, WALBOOMERS XF, DOMANSKI M, TE RIET J, VAN DELFT FC, LUTTGE R, WINNUBST LA, GARDENIERS HJ, JANSEN JA. The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. **Biomaterials.**, v.31, n.12, p.3307-16, 2010.

LEVINE RA, CLEM D, BEAGLE J, GANELES J, JOHNSON P, SOLNIT G, KELLER GW. Multicenter retrospective analysis of the solid-screw ITI implant for posterior single-tooth replacements. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v.17, n.4, p.550-6, 2002.

MA L, ZHENG LW, SHAM MH, CHEUNG LK. Uncoupled angiogenesis and osteogenesis in nicotine-compromised bone healing. **J Bone Miner Res.**, v.25, n.6, p.1305-13, 2010.

MA L, ZWAHLEN RA, ZHENG LW, SHAM MH. Influence of nicotine on the biological activity of rabbit osteoblasts. **Clin Oral Implants Res.**, v.22, n.3, p.338-42, 2011.

MACHADO GJ, DIAS SM, BOSCO AF, OKAMOTO T, BEDRAN DE CASTRO JC, DORNELLES RC. Action of nicotine and ovariectomy on bone regeneration after tooth extraction in rats. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.68, n.11, p.2675-81, 2010.

MARCO F, MILENA F, GIANLUCA G, VITTORIA O. Peri-implant osteogenesis in

health and osteoporosis. **Micron.**, v.36, n.7-8, p.630-44, 2005.

MENDONÇA G, MENDONÇA DB, ARAGÃO FJ, COOPER LF. Advancing dental implant surface technology-from micron- to nanotopography. **Biomaterials.**, v.29, n.28, p.3822-35, 2008.

MENG W, ZHOU Y, ZHANG Y, CAI Q, YANG L, WANG B. Effects of hierarchical micro/nano-textured titanium surface features on osteoblast-specific gene expression. **Implant Dent.** v.22, n.6, p.656-61, 2013.

MICHIARDI A, APARICIO C, RATNER BD, PLANELL JA, GIL J. The influence of surface energy on competitive protein adsorption on oxidized NiTi surfaces. **Biomaterials.**, v.28, n.4, p.586-94, 2007.

NOCITI JÚNIOR FH, CESAR NETO JB, CARVALHO MD, SALLUM EA, SALLUM AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. **J Periodontol.**, v.73, n.9, p.982-7, 2002.

OKAMOTO M, KITA T, OKUDA H, TANAKA T, NAKASHIMA T. Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. **Pharmacol Toxicol.** v. 75, n. 1, p.1-6, 1994.

PINTO JR, BOSCO AF, OKAMOTO T, GUERRA JB, PIZA IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. **Braz Dent J.**, v.13, n.1, p. 3-9, 2002.

ROTHEM DE, ROTHEM L, DAHAN A, ELIAKIM R, SOUDRY M. Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. **Bone.**, v.1, n.48, p.903-9, 2011.

SÁNCHEZ-PÉREZ A, MOYA-VILLAESCUSA MJ, CAFFESSE RG. Tobacco as a risk factor for survival of dental implants. **J Periodontol.**, v. 78, n. 2, p. 351-9, 2007.

SATO N, KUBO K, YAMADA M, HORI N, SUZUKI T, MAEDA H, OGAWA T. Osteoblast mechanoresponses on Ti with different surface topographies. **J Dent Res.**, v.88, n.9, p.812-6, 2009.

SØRENSEN LT. Wound healing and infection in surgery: the pathophysiological impact of smoking, smoking cessation, and nicotine replacement therapy: a systematic review. **Ann Surg.**, v.255, n.6, p.1069-79, 2012.

STEFANI CM, NOGUEIRA F, SALLUM EA, DE TS, SALLUM AW, NOCITI FH JR. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. **J Periodontol.**, v.73, n.2, p.206-12, 2002.

SZABO G, MANDREKAR P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.33, n.2, p.220-32, 2009.

TANAKA H, TANABE N, SUZUKI N, SHOJI M, TORIGOE H, SUGAYA A, MOTOHASHI M, MAENO M. Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. **Life Sci.**, v.77, n.18, p.2273-84, 2005.

THAKRAL G, THAKRAL R2, SHARMA N3, SETH J3, VASHISHT P3. Nanosurface - the future of implants. **J Clin Diagn Res.**, v.8, n.5: p.07-10, 2014.

UCAR Y, BRANTLEY WA, JOHNSTON WM, IJIMA M, HAN DS, DASGUPTA T. Microstructure, elemental composition, hardness and crystal structure study of the interface between a noble implant component and cast noble alloys. **J Prosthet Dent.**, v.106, n.3, p.170-8, 2011.

WANG XX, HAYAKAWA S, TSURU K, OSAKA A. A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces. **J Biomed Mater Res.**, v.54, n.2, p.172-8, 2001.

WONG LS, MARTINS-GREEN M. Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. **Wound Repair Regen.**, v.12, n.4, p.471-84, 2004.

YIN L, MORITA A, TSUJI T. Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. **Arch Dermatol Res.**, v.292, n.4, p.188-94, 2000.

ZUPNIK J, KIM SW, RAVENS D, KARIMBUX N, GUZE K. Factors associated with dental implant survival: a 4-year retrospective analysis. **J Periodontol.**, v.82, n.10, p.1390-5, 2011.

TABELA

Médias e desvio padrão (M $\pm$ DP) dos dados biomecânicos (N.cm) em cada grupo e períodos.

Grupos	n	Períodos	
		30 dias	60 dias
SS-AC	20	9,67 $\pm$ 2,18 [#]	13,62 $\pm$ 4,34 [*]
SS-Nano	20	5,71 $\pm$ 1,98	10,25 $\pm$ 2,49 [*]
NIC-AC	20	9,56 $\pm$ 3,17 [#]	11,14 $\pm$ 4,85
NIC-Nano	20	7,00 $\pm$ 2,35	10,11 $\pm$ 2,37 ^{*†}
n	80	40	40

[#]Diferença estatisticamente significativa com o Grupo SS-Nano no mesmo período (ANOVA e teste de Tukey $p \leq 0,05$).

[†]Diferença estatisticamente significativa com o Grupo SS-AC no mesmo período (ANOVA seguido pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$).

^{*}Diferença significativa com 30 dias pós-operatório (ANOVA seguido pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$).

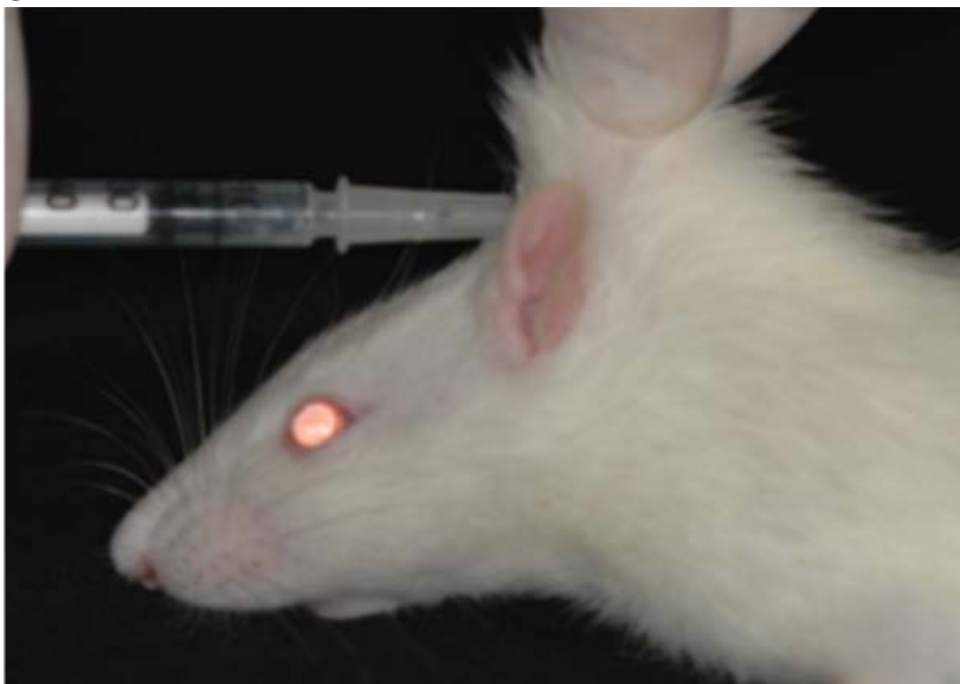
FIGURAS

Figura 1: Aplicação de injeções subcutâneas de solução salina nos animais dos grupos SS e nicotina nos animais dos grupos NIC.



Figura 2 - Incisão pelo lado medial da tíbia e exposição do tecido ósseo com descolador de periósteo.

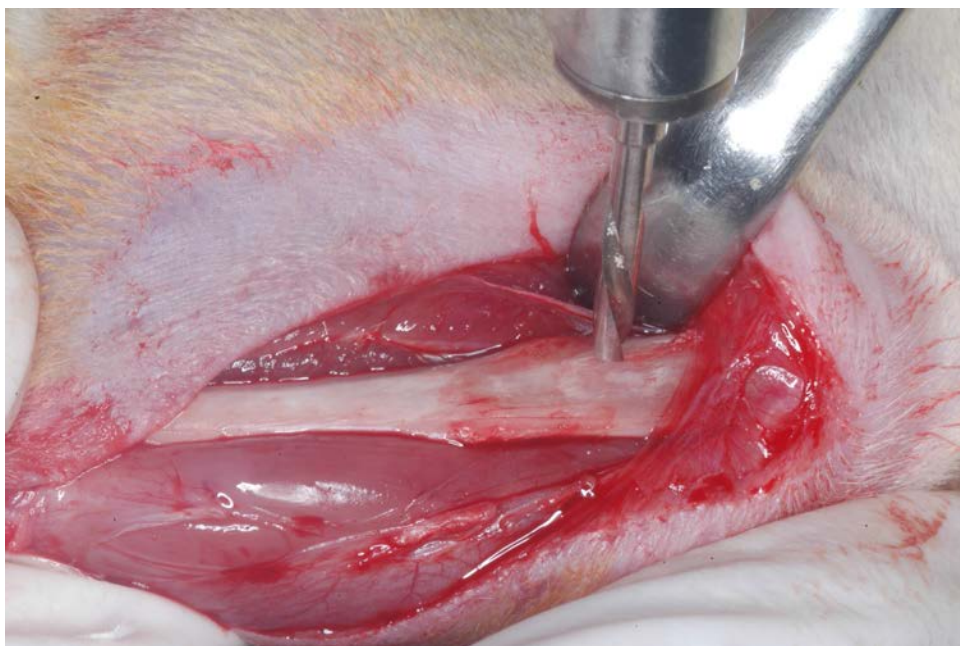


Figura 3 – Preparo do alvéolo cirúrgico na metáfise proximal com broca.

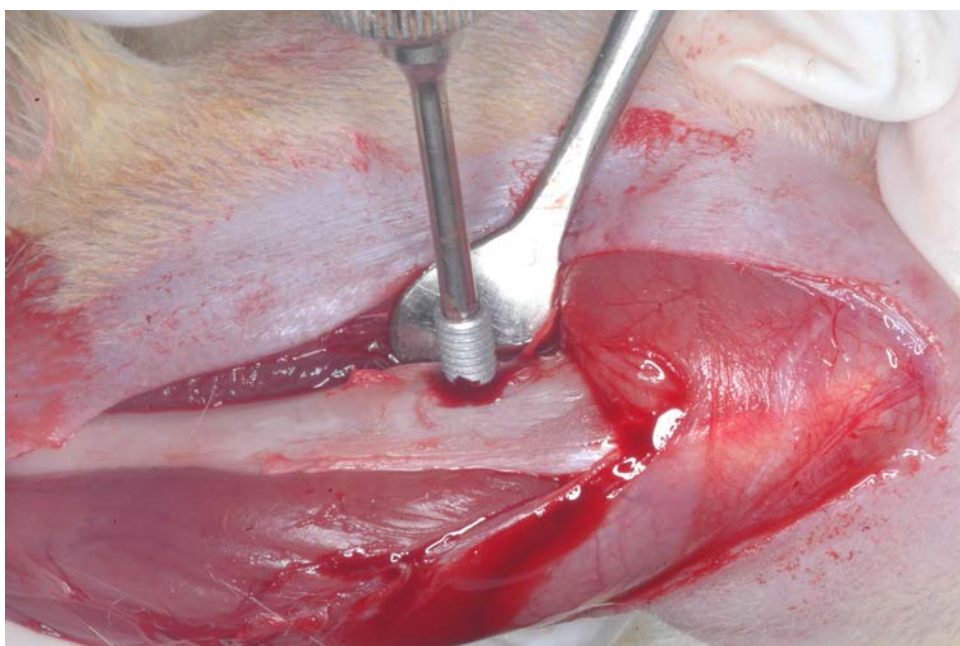


Figura 4 – Instalação do implante no alvéolo cirúrgico com auxílio de uma chave digital acoplada ao hexágono do implante.



Figura 5 - Peça estabilizada em morsa para avaliação biomecânica.



Figura 6 - Contra torque de remoção dos implantes.

ANEXO**Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Aracatuba

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação biomecânica da influência da microgeometria na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos expostos à nicotina" sob responsabilidade do Pesquisador **JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA** e colaboração de Leticia Helena Theodoro, Valdir Gouveia Garcia, Bruno Flumian, Edra Carla Dias Stoque, Mariellen Longo e Paula Lazilha Faleiros está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **01641-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Biomechanical evaluation of the influence of microgeometry in the osseointegration the implants installed in tibiae rats exposed to nicotine", process number **01641-2012**, under responsibility of **JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA** and with collaboration of Leticia Helena Theodoro, Valdir Gouveia Garcia, Bruno Flumian, Edra Carla Dias Stoque, Mariellen Longo and Paula Lazilha Faleiros agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli
 CEUA Coordinator